

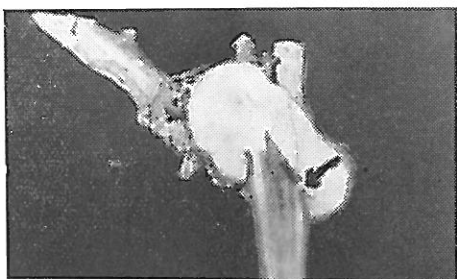
## A szőlőoltványok barnafoltosságáról és az azt előidéző oxidáló enzimrendszerek szerepéről

EIFERT JÓZSEF

Szőlészeti Kísérleti Laboratórium, Villány

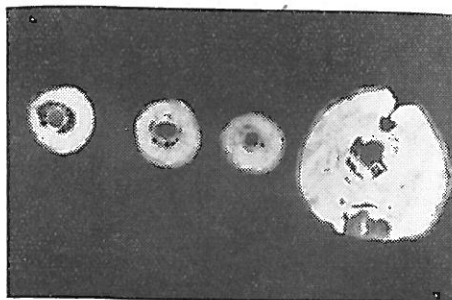
A gyakorlatból általánosan ismert a szőlőoltványok és dugványok fekete- vagy barnafoltossága. A jelenség leírásával a szakirodalomban is gyakran találkozunk, de csak a legkritikább esetben tárgyalják egymagában, mint pl. K u p o r i c k á j a (6) (nyekróz elnevezéssel), inkább a szőlőtőkék időelőtti leromlásával, törpeágúságával, malnéróval stb. együtt, illetőleg ezek egyik okozójaként emlegetik. [Barra (2), Barra és Hegedüs (4) és Zweigelt (15)].

A szőlőoltványok u. n. barnafoltosságát minden egyéb szövetbarnulásban is megnyilvánuló megbetegedéstől jól megkülönböztethető, pontosan identifikálható jelenségnek tartjuk. A jelenség alapos szövettani leírása mind a hazai (4), mind a szovjet szakirodalomból (6) már ismeretes, ezért csak röviden vázolom.



1. ábra

Kétéves oltványszőlő forradáshelye hossz-  
metszetben. Barnafoltos részek az első évi fában.  
A nyíl a nemes ráforradását jelzi. *Berlandieri* ×  
*Ripária* T. 5C + *Kékfrankos*

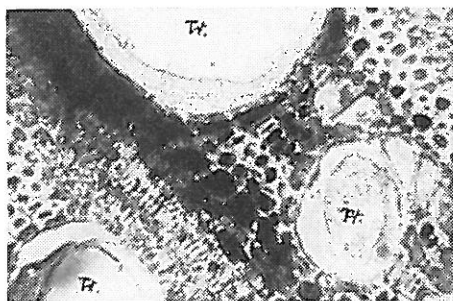


2. ábra

Ötéves barnafoltos oltványszőlő (*Berlandieri* ×  
*Ripária* T. K. 5BB + *Kékfrankos*) törzséből  
készült keresztmetszetek. Balról jobbra:  
a) 4 cm-re a tőtől; b) 15 cm-re a tőtől;  
c) 25 cm-re a tőtől (középső internódium);  
d) Az oltás helyén

A barnafoltosság az iskolából kikerült oltványokon és dugványokon az első évi farészben szembetűnő. Keresztmetszetben barna gyűrű vagy pontok formájában, hossz-metszetben barna csíkokban vagy sávokban látható. A barnulás mérve a tő (talp) és oltáshely (metszlapok) közelében a legerősebb, az alany közepe felé fokozatosan csökken. Barnulás látható kisebb-nagyobb mértékben a nemesrészben is (1. és 2. ábra). A barnafoltos oltványokon külső elváltozás nem látható. Barnulás nem tapasztalható a háncs (élőkéreg), a második évi fa, illetőleg a fiatal hajtások szöveteiben. Mikroszkópiusan még pontosabban sikerült lokalizálni a barnulás

helyét a szövetekben. A kezdetben világossárga, majd később sötétbarna mézgaszerű anyag leggyakrabban a tracheákban, tracheidákban, faparenchimákban jelenik meg (5. 6. és 9. ábra). Sok esetben kitölti a barna anyag a tracheák közvetlen közelében elhelyezkedő rekeszesrostokat és a bélsugársejtek sejtüregét is (3. és 4. ábra). A szokottnál nagyobb számban keletkezett tilliszek is jórészt megbarnulnak. A bélkorona sejtjei is legtöbbször barnák. Átjárja a barna anyag a sejt-falakat is (3. és 6. ábra).



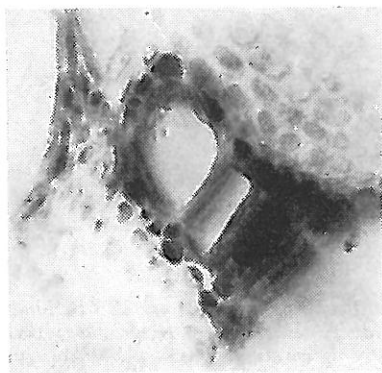
3. ábra

A tracheák (Tr) közvetlen szomszédságában lévő bélsugár- és parenchimasejtek intenzíven barnultak. A barna színanyag a sejt-falakat is átjárta. (*Berlandieri* × *Ripária* T. 5C + *Kékfrankos*) Nagyítás: 230 : 1



4. ábra

A barnafoltos rekeszesrostok keresztmetszetben (*Berlandieri* × *Ripária* T. 5C + *Kékfrankos*)  
Nagyítás: 230 : 1



5. ábra

Barnafoltos tracheida és parenchima sejtek (*Ripária portalis* + *Kékfrankos*) Nagyítás: 290:1



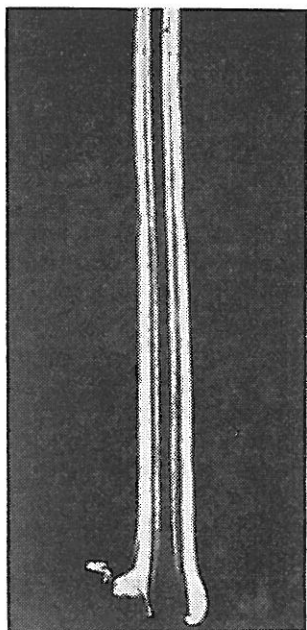
6. ábra

Ötéves oltványszőlő törzséből készült keresztmetszet. A barnafoltos első évi faszövetek élesen elhatárolódnak az egészséges második évitől (*Berlandieri* × *Ripária* T. 5C + *Kékfrankos*) Nagyítás: 230 : 1

Mind a makro-, mind a mikroszkópikus megfigyelés azt mutatja, hogy a barnulás a faszövetrendszerben nem mindenütt egyenlő mértékben következik be. Legnagyobb és legintenzívebb a barnult terület a metszlapok közvetlen közelében, (tő és oltáshely) és azoktól távolodva fokozatosan csökken, különösen nodusz után (7. és 8. ábra). Magán a barna területen belül keresztmetszetben két sötétebb gyűrűt találunk, az egyik (keskenyebb) a bélkorona gyűrűje, ennek színe a bél-

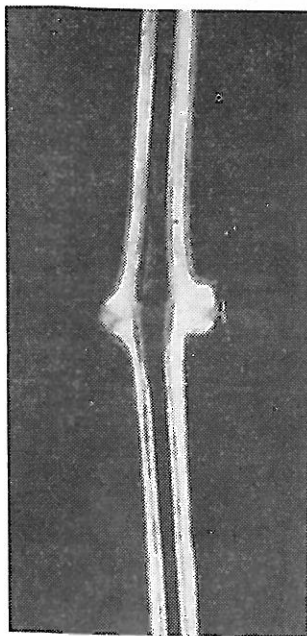
szövetével egybeolvad ; a másik külső széle az évgyűrű, a volt kambium vonalával esik egybe (6. ábra). Közöttük a kevésbé barnult faelemek világosabb gyűrűje látható (10. ábra C és 2. ábra).

A barnulás az előhajtott oltványokon intenzívebb, mint az előhajtás nélkül



7. ábra

Hároméves oltványszőlő (*Berlandieri* x *Riparia* T. 5C + *Kékfrankos*) törzse hosszmetsetben

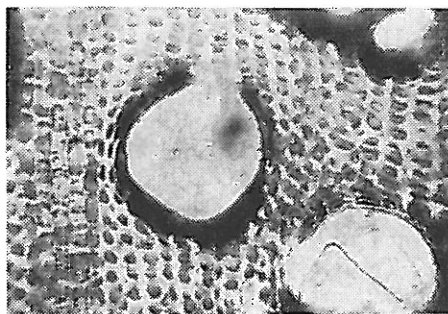


8. ábra

Mint 7. ábra. U. a. alanyak alulról a második nódusza

készülteken, vagy mint a gyökeres vesszőkön. Befolyásolja még az oltás forradás minősége is (4). Azonos körülmények között az egyes alanyfajtákon a barnafoltosság kifejlődésének mértéke különböző. Pl. gyengén barnafoltos : *Rupestris du Lot*, *Rupestris metallica* ; közepesen : *Riparia* x *Rupestris* keresztezések ; erősen : a *Rip. portalis* és a *Berlandieri* x *Riparia* keresztezések.

A barnafoltosság okának magyarázatára a legkülönbözőbb feltevéseket találhatjuk. A kutatók egy része kórtani [Zweigelt (15), Nagornüj (6), Kostyuk (6), stb.] másrésze élettani megbetegedésnek tartja. Barra és Hegedüs



9. ábra

A tracheákat gyűrű alakban veszik körül a megbarnult parenchimasejtek. (*Riparia portalis* + *Kékfrankos*) Nagyítás : 230 : 1

(4) abból következtetve, hogy a gyökereztető iskolából kikerülő dugványokon a barnafoltosság mértéke kisebb, mint az előhajtított oltványokon, a következőket írja: »... az oltványkészítéssel kapcsolatos egyes kedvezőtlen tényezők nagyban hozzájárulnak a baj előidézéséhez« (4). A Z w e i g e l t (15) által leírt »roncet« nevű betegség szimptomáiban azonosnak látszik az egyes szovjet kutatók által leírt nyekrózzal. Míg azonban Z w e i g e l t az erősen tilliszesedett, gumi-tartalmú tracheákban gombát és baktériumot talált, és szerinte a betegség elterjedése infekció jellegre mutat, addig Sz. M e l j n y i k és B o r g g a r d t (6) szovjet kutatók véleménye szerint a »yekróz« nem gomba okozta fertőzés következménye, azok legfeljebb csak másodlagosan vannak jelen. Másutt Z w e i g e l t (15) a barnafoltosságot előzetes legyengülés másodlagos következményének tartja.

Az irodalomban tapasztalható ellentmondások, továbbá a kérdésnek nagy gyakorlati fontossága késztetett arra, hogy a jelenség igazi okozóját keressük.

### Tájékozódó vizsgálatok és elvi megfontolások

Megfigyeltük, hogy :

1. Bármennyire barnafoltos is egy oltvány az iskolában, újonnan, tehát az utolsó metszlap készítése után létrejött faelemekbe a barnulás nem terjed át. Ha egy idősebb sértetlen tőke törzsét vágjuk keresztbe, láthatjuk, hogy a barna gyűrű csak az oltáskor már meglevő farészre korlátozódik (2. és 7. ábra).

2. Az oltványokon fejlődő sértetlen vesszőkben és gyökerekben barnulás nem fordul elő, annak ellenére, hogy mind a nemes, mind az alany barnafoltos volt.

3. A fagymentes, sértetlen európai és amerikai ültetvények vesszőiben a fentiekben ismertetett barnafoltosság nem található, viszont kivétel nélkül minden oltvány és dugvány kisebb-nagyobb mértékben barnafoltos.

Ha a barnafoltosságot kórokozó idézné elő, a jelenség nem korlátozódna csupán az oltáskor már meglevő faszövetrendszerre, hanem áttérjedne újonnan képződött faelemekre is. Ha a mikroorganizmusok elsődleges okozói lennének a barnulásnak, akkor azok a még el nem színeződött részekben is már megtalálhatók volnának, de legalább is a barna részekben mindenütt előfordulnának. Fertőzőses megbetegedés esetén a betegség nem volna feltétlenül általános minden vidéken és minden oltványon.

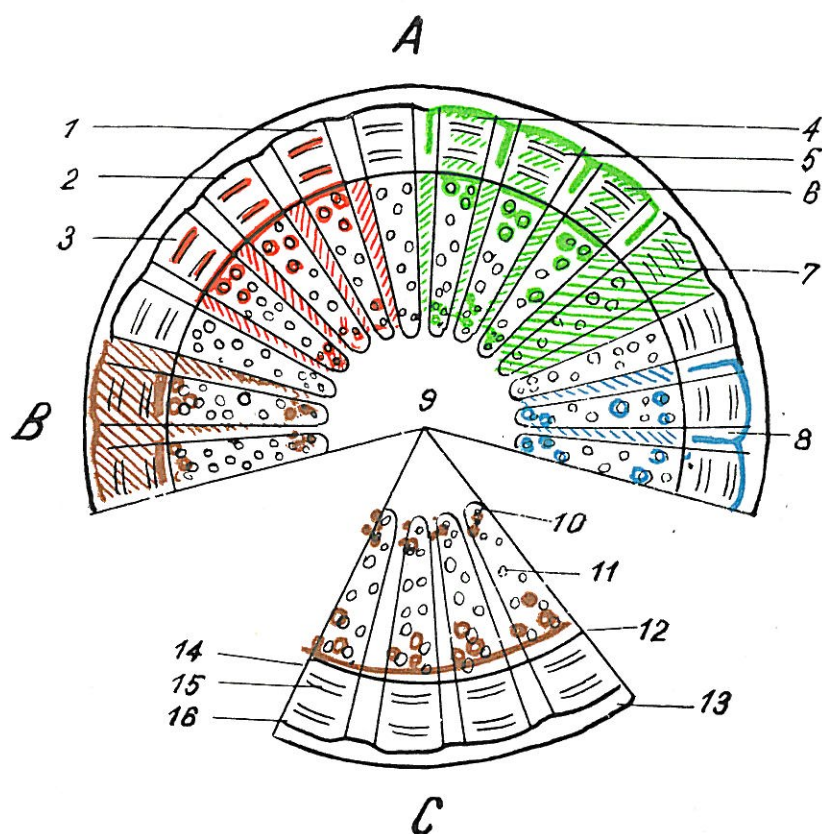
Fent ismertetett körülmények arra a megfontolásra vezettek, hogy a betegség okát élettani jelenségekben keressük.

Ha amerikai vagy európai szőlőültetvényeinket, vagy akár bármilyen más fásodott növényt figyelmesen megvizsgálunk, igen gyakran találhatunk a faszövetekben jellegzetes barnafoltossághoz nagyon hasonló elváltozást. Figyelmes szemlélés megmutatja, hogy minden ilyen barnulás közelében valamilyen, a faszövetig terjedő, sejtroncsolást eredményező sebzést, sérülést találunk (pl.: kacshasítás, jégverés, kapavágás, dörzsölés, rágás, stb.). A fagyfoltok okozta barnulás abban különbözik a barnafoltosságtól, hogy együttjár a hánccszövetrendszer barnulásával és innen terjed befelé.

Tehát a szövetek barnafoltossága minden esetben, bárhol fordul is elő, a vesszőn keletkezett mechanikai, vagy élettani (fagy) sérülés okozta elváltozás eredménye. Esetünkben a metszlapok készítése jelenti a sebzést.

Mind a szőlőoltványok barnafoltossága, mind egyéb helyen, sérülés következtében létrejött barnulás azonosnak látszik az először P a l l a d i n (7) által 1908-ban ismertetett feketedéssel, mely vágási felületeken polifenoloxidáz (PPO) enzimek hatására keletkezik és amit ő kinonosodásnak nevez.





10. ábra

A : Szubsztrátumok oxidációjának helyei. B : Metszlap természetes barnulása. C : Barnafoltosság keresztmetszeti képe. 1 : Tirozin. 2 : Fenol. 3 : p—m Krezol. 4 : Katechol. 5 : Pirogallol. 6 : Guajakgyanta. 7 : Hidrokinon. 8 : p-Feniléndiamin. 9 : Bél. 10 : Bélkorona. 11 : Trachea. 12 : Kambium. 13 : Paraszövet. 14 : Puhaháncs. 15 : Keményháncs. 16 : Parakambium

Ebből a gondolatból kiindulva, figyelemmel kísértük a vessző barnulási folyamatát. Az alanyvesszők — oltásra előkészítéskor — friss metszlappal kerülnek az oltóasztalra. A metszlap egy-két óra alatt sárgásbarna színű lesz. A színváltozás mikroszkópikus képe azonos a fentebb leírt barnafoltosság képével, azzal a különbséggel, hogy a hancsszövetrendszer és a bélsugarak is barnultak. Levegőtől elzárva, víz alatt tartva a metszlapot, a barnulás csak sokkal később és kisebb mértékben következett be, mint levegőn. Kézenfekvővé vált az a feltevés, hogy a színképződéshez levegő, ill. molekuláris oxigén szükséges, vagyis a metszlap barnulása oxidációs folyamat. Kísérletileg ezt oly módon sikerült igazolni, hogy a frissen barnult metszlapot M/100-as koncentrációjú aszkorbinsav oldatba helyeztük, mire a barna szín percekben belül eltűnt, vagyis az aszkorbinsav a színyanyagot redukálta.  $O_2$  mentes közegben a barnulás nem következett be (forralt víz).

Annak eldöntésére, hogy az oxidációs folyamat enzimatikuss-e vagy autokatalitikus, a következő kísérleteket végeztük:

1. Megállapítottuk, hogy a barnulás mértéke a hőmérséklettel korrelációban van.  $H_{opt}$  35—40 °C.
2. Termolabilis. — 0 °C körül és 60 °C körül a barnulás erősen gátolt, forrással teljesen megszüntethető.
3. pH optimuma 7,5 és 8,5 között van.
4. CO és HCN a barnulást tökéletesen gátolta.
5. Az érett vessző nyugalmi periódusában (jan. első fele) a metszlap optimális körülmények között is csak igen későn és gyengén barnult, míg ugyanaz márciusban azonos körülmények között már 1—2 órán belül elszíneződött.

P a l l a d i n (7) óta sokan foglalkoztak a növényi sérülések barnulásának okával. Csak néhány legfontosabb idevonatkozó irodalmi állásfoglalást megemlítve, S z e n t - G y ö r g y i (13), majd S u t t e r (13) későbbi elméletére kell hivatkoznunk. Mindketten ugyancsak a PPO rendszernek tulajdonítják a folyamatot. S z e n t - G y ö r g y i szerint a PPO-nak a normális sejt működésben nincs szerepe, csak a sértett, zúzott sejtekben fejtik ki működésüket, ahol az  $O_2$  felvétel 15-ször is nagyobb a normálisnál, és ahol zúzódáskor az enzim kapcsolatba kerül szubsztrátumával, ami a működés előfeltétele. Szerinte ép sejtben a szubsztrátum és az enzim nem kerülhet egymással kapcsolatba. — Később S u t t e r (13) kimutatta, hogy a PPO enzimrendszer a sértetlen sejtek oxidációs folyamataiban is részt vesz. Sebzéskor azonban a sértett felületeken az  $O_2$  diffundálása és így a fenolok oxidációja gyorsabb, mint a belőlük keletkező kinonok redukciója. A kinonok H-akceptorként szerepelnek a dehidrogénáz számára [S u t t e r (13)]. Ugyanis a redukáló sejt-tartalom odavándorlása lassú, helyesebben a dehidráz enzimrendszer sérüléskor tönkremegy. A kinonok tehát felhalmozódnak. A legújabb kutatások szerint pedig a PPO-knak a citokrom rendszertől független terminális oxidációs működése is ismert (tea és spenót) [D a w s o n (5)].

Kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a szőlőnél jelentkező barnulás, mely kétséget kizáróan oxidáló enzimrendszer működésének eredménye, azonosítható-e a fenti elméletek szerinti kinonosodási folyamatokkal. El kellett döntenünk, melyik oxidáló enzimrendszer felelős a barnafoltosságért. Az irodalmi adatok alapján az ismert tirozináz vagy polifenoloxidáz ill. a lakkáz enzimrendszerek jöhetnek szóba. A barnulást sötétben és világosban egyaránt gátolni tudtuk CO-val. Ismeretes az, hogy a CO a tirozináz (PPO) enzimrendszerek működését gátolja, míg a lakkázét nem. Ebből önként adódik a megállapítás, hogy a szőlővessző metszfelületén keletkezett barnulásért, ill. mint a későbbiekben látni fogjuk, a szőlőoltványok barnafoltosságáért a tirozináz (PPO) enzimrendszer felelős.

A tirozinázt 1895-ben Bourqu elot és Bertrand (5, 12) a *Russula nigricans* gombában fedezte fel. Bertrandl identifikálta a szubsztrátumot: a tirozint. Magát az enzimet 1938-ban kristályosították ki, pH-optimuma 6—8,5 [R a p e r és W o r m a l l (10)]. A későbbiekben sikerült megállapítani, hogy ez az enzim képes más monofenolokat, sőt dihidrikus fenolokat is oxidálni (Monofenol szubsztrátumok: fenol, p-krezol, m-krezol). Attól függően, hogy a tirozináz név alatt összefoglalt, Cu-tartalmú enzimrendszer milyen jellegű fenolokra hat, monofenolázról (krezoláz) difenolázról (catecholáz), [D a w s o n (5)] és polifenoloxidázokról [guajakol, R a p e r (9) és S u t t e r (13)], beszélhetünk. Az irodalom szerint a polifenoloxidáz szubsztrátuma a catechol is lehet.

Az elmondottakból láthatjuk, hogy a tirozináz enzimrendszer működési területe a fenolok oxidációjának katalizálásában igen kiterjedt lehet és az növényenként is változó. Éppen ezért hisztokémiai és más minőségi módszerekkel szükségesnek látszott megállapítani, hogy a szőlővesszőben levő tirozináz enzimrendszer milyen típusú fenolok oxidációját, hol és megközelítőleg milyen intenzitással képes katalizálni.

### Vizsgálati anyag és módszer

A vizsgálatok céljára a szőlővesszőből borotvával hossz- és keresztmetszeteket, továbbá zúzással, szűréssel kivonatokat készítettünk és ezekben vizsgáltuk a különböző mesterségesen adagolt szubsztrátumok, gátló anyagok, pH értékek hatását. A metszeteket az oxigén biztosítása érdekében szűrőpapíron úsztatva helyeztük a reagensekbe.

A fa és hancs reszelékéből mikrodezinintegrátor segítségével készítettünk kivonatot.

Szubsztrátumként a vizsgálatokhoz tirozint, fenolt, p- és m-krezolt, cateholt, hidrokinont, pirogallolt, p-feniléndiamint M/50-es, és guajakgyantát 96%-os alkoholban 2%-os koncentrációban használtunk. A szubsztrátumokhoz 8,5 pH-s veronál-acetát puffert adagoltunk. A kísérlet folyamán használtunk acetát és foszfát puffereket is.

Gátló anyagok közül felhasználtuk a CO-t, NaCN-t, p-nitrofenolt, tiokarbamidot, allitiokarbamidot és az aszkorbinsavat, különböző koncentrációkban.

### Kísérleti eredmények és azok értékelése

Mivel a tirozináz enzimrendszer többirányú működésre képes, tehát szorosan véve nem szubsztrátspecifikus, kíváncsúnak látszott működésének egyes főirányait a szőlővesszőben megállapítani és azokat lokalizálni. Az egyes fenoláz-szubsztrátumoknak a szövetekbe történt mesterséges bejuttatása világos képet nyújtott az enzimtevékenység kvalitatív megoszlásáról. Már itt hangsúlyozzuk, hogy a vizsgálatokat januártól május végéig *Rip. port.* és *Berl. x Rip. T. 5 C* egyéves beérett vesszőkön végeztük. Feltehető, hogy a vessző fejlődése során az enzimrendszer működési irányában is lényeges eltolódások lehetségesek, de a barnafoltosság nézőpontjából éppen az említett időszak a lényeges.

A szőlővesszőben a tirozináz ill. PPO ismeretes legfőbb irányait sikerült kimutatni:

1. A monofenolázok, mint azt a p-, m-krezol, a fenol és a tirozin oxidációja mutatja, túlnyomórészt a faszövetekben helyezkedik el, és pedig kifejezetten azokban a szövetelemekben, melyeknek jelentőségét a barnafoltosság nézőpontjából

már fentebb ismertettük (intenzíven a kambium és a mellette levő faelemek, a bélkorona; gyengébben a többi faelem és a fabélsugár) (10. ábra A: 1, 2, 3). A hánccsszövetrendszerben (élőkéreg) csak a keményhánccs mutat aktivitást, ez azonban kivonatban már nem is jelentkezett (ezen sejtek elroncsolása eszközeinkkel lehetetlen).

2. A guajakgyanta élénk oxidációja mutatta a *PPO-ok* jelenlétét (10. ábra A:6).

3. Az ortofenolok közül a katechol és a pirogallol oxidációja az *ortofenolázok* jelenlétére utal (10. ábra A: 4, 5).

4. A *parafenoláz* működését a hidroknonon oxidációja jelzi (10. ábra A: 7). Valamennyi polifenol oxidálódási helye azt mutatja, hogy az ilyen irányú enzim-működés legintenzívebb a hánccsszövetrendszerben, nevezetesen a bélsugársejtekben és a parakambiumban, valamint a puhahánccs parenchima- és kísérősejtjeiben. Szembetűnő, hogy ellentétben a monofenoloxidázokkal, a kambium-bélsugársejtek nem színeződtek. A faszövetekben az intenzív színeződés helyei azonosak a bélsugársejtek kivételével, a monofenolok mutatta képpel. A parafenoláz működésének jellegzetesen intenzív helyei nem voltak.

5. A *lakkáz* jelenlétére az a körülmény utal, hogy a p-feniléndiamin ugyancsak oxidálódik. Ezt a felsorolt fenolázok közül csak a lakkáz képes oxidálni [Dawson (5), Raper (8), Sumner és Somers (12)]. Valójában a lakkáz is egy polifenoloxidáz. Az oxidáció jellemző helyei a hánccsban ugyanazok, mint az ortofenolázok esetében: a hánccsbélsugársejtjei és a parakambium. A fában pedig gyengén és szórványosan ugyancsak az ortofenolázoknál említett helyeken. Feltűnő, hogy a kambium vonalában nincs színeződés (10. ábra A: 8.).

Fentieket áttekintve megállapítható, hogy a szőlővesszőben, a *PPO* irányú dominál a hánccsszövetrendszerben és intenzív a faszövetekben is. A *monofenolázok* jelen vannak a faszövetekben és intenzívek a kambiumban. Ugyancsak jelen van a *lakkáz* is, mind a fában, mind a hánccsban (10. ábra A.).

Ha már most összehasonlítjuk az így nyert képet a metszlap természetes barnulásával, az alábbiakat állapíthatjuk meg:

Mint a bevezetőben említettük, a metszlapon barna a hánccsszövetrendszer, amely megfelel a *PPO-k* működési területének. A faszövetrendszer, valamint a kambium vonalának erős megbarnulásában a mono- és polifenoloxidázok egyaránt részt vesznek. A természetes barnulási folyamatban a lakkáz nem vesz részt, ezt bizonyítja az, hogy a természetes barnulást a CO gátolja (10. ábra B.).

A szőlővesszőben nagy mennyiségben kimutatható *peroxidáz* a természetes barnulási folyamatban ugyancsak nem játszhat lényeges szerepet, mert egyrészt a CO ezt éppúgy mint a lakkázt nem gátolná, másrészt pedig a peroxidáz szempontjából legaktívabb helyen: a hánccsban a monofenolok oxidációja nem következik be, holott a peroxidáz ezekre is képes volna hatni.

A vizsgálatok kontrolja egyrészt felfőzött metszet volt, másrészt olyan sorozatot is állítottunk be, melynél a szubsztrátummal egyidőben aszkorbinsavat is adagoltunk. A reakció mindkét esetben kimaradt. A rendszert veronál-acetát, pufferral pH 8,5-re állítottuk be. Tekintettel a pirogallol és hidrokinon természetére, ezekkel savanyú közegben (6,5—6,8 pH) dolgoztunk.

Fenti vizsgálatokat külön a hánccsból, külön a fából készült kivonatokkal is elvégeztük (kvalitativ). A táblázat értékei a hisztokémiai vizsgálatokkal megegyeznek. A CO nem gátolta teljesen a *polifenolok* oxidációját, ebből is a lakkáz jelenlétére következtethetünk. Ugyanakkor a monofenolok oxidációját a CO tökéletesen gátolta. A gátló hatás megfigyelésére a kivonatok tisztított CO gázzal telítettük. Az eredményeket két óra elteltével olvastuk le.

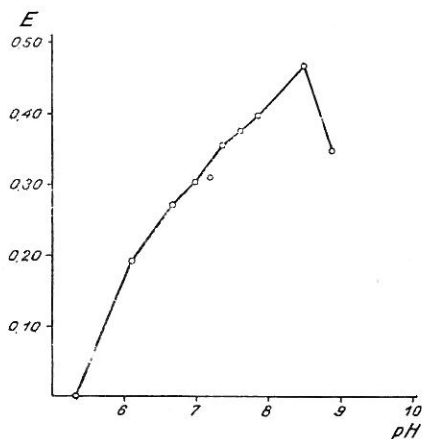


1. táblázat

(1) Szubsztrátum	(2) Háncs-kivonat			(3) Fa-kivonat		
	(4) Nyers	(5) Forralt	(6) CO-val telítve	(4) Nyers	(5) Forralt	(6) CO-val telítve
Fenol .....	—	—	—	++	—	—
p-krezol .....	—	—	—	+++	—	—
m-krezol .....	—	—	—	++	—	—
katechol .....	+++	—	+	++	—	+
pirogallol .....	++	—	+	+	—	+
hidrokinon .....	+	—	+	+	—	+
p-feniléndiamin .....	+++	—	+++	++	—	++

Elszíneződés mértéke: nincs: —, gyenge: +, közepes: ++, erős: +++.

Az oxidáció pH-optimumának a fakivonatban történő meghatározásakor szubsztrátumként a lassan oxidálódó tirozin helyett 0,2%-os koncentrációban p-krezolt használtunk [R a p e r (8)]. Mind a metszetek természetes barnulásának, mind a p-krezol kivonatban történő oxidálódásának pH optimumát veronálacetát pufferben határoztuk meg. A *metszetek természetes barnulásának* mértékét 24 óra elteltével vettük fel. A barnulás 6,1 pH-n kezdődött és a legintenzívebb 8,5 pH-n volt. A kivonatban a p-krezol oxidációjának pH-optimumát a 11. ábra jól mutatja. Ez megegyezik az előbb említett 8,5 pH értékkel. A reakciót két óra elteltével Pulf-rich fotométerben S 50-es szűrővel értékeltük ki.



11. ábra

p-krezol oxidációjának pH-optimuma

bizonyítja egyrészt az a körülmény, hogy a barnulási helyek szövettanilag azonosak, másrészt, hogy azok a gátló anyagok, melyek a barnulást a felületen megakadályozták, hatásukat ugyanakkor a belső szövetrészekben is kifejtik. Arra nézve, hogy az elszíneződés miképpen jut el a metszlaptól sok cm távolságra, két elgondolás jöhet számításba.

1. A metszfelületen képződött kinonok diffúzióval felszívódnak.

2. A sebzés következtében a laza szövetrészekben keresztül (tracheák) nagymennyiségű levegő jut a szövetekbe. Az oxigén parciális nyomása a szövetekben megnő és ez a redox-rendszert a sértetlen részekben is az oxidáció irányába tolja el, minek következtében kinonfelhalmozódás áll be.

A hánccsszövetek, a faszövetektől eltérően, a metszfelülettől távol — véleményünk szerint — azért nem barnulnak meg, mert a minden egyes sejtet kitöltő megbarnult plazma eltömi a sejtüregeket és a levegő bejutását így teljesen megakadályozza. Viszont a plazma nélküli, tág-üregű tracheák eltömődése csak részleges, a kinonpolimerizátumok nem képesek őket kitölteni. Így lehetséges, hogy a rajtuk keresztül beáramló oxigén káros hatása ellen kénytelen a növény, még a sebzési felülettől távol is, faparenchima sejtjeinek eltömésével, kinonosodásával védekezni (5. ábra).

Fentiek magyarázatul szolgálnak arra nézve is, hogy az eltérő anatómiai felépítésű (laza, ill. tömött szövetű és különböző internodium-hosszúságú) alanyfajták, miért hajlamosak különböző mértékben a barnafoltosságra.

Szükségesnek tartjuk még megjegyezni, hogy a színanyag kezdetben világos-sárga kinon, majd később a kinonok kondenzálódásával keletkező sötétbarna vegyület, tehát nem fekete színű melanin. A fában természetes szubsztrátumként nem lehetett tirozint kimutatni (Millon reakció).

Az irodalomból ismert, a PPO enzimrendszer működést gátló anyagok in vitro metszetekben és vessződarabokban a barnulás kifejlődését gátolták (p-nitrofenol, alliltiokarbamid, tiokarbamid : kompetitív gátlás ; ill. aszkorbinsav : redukáló hatás).

### Összefoglalás

Vizsgálataink alapján bizonyítottnak tekintjük, hogy az oltványok és dugványok barnafoltosságát (nyekróz) valóban a tirozináz ill. PPO enzimrendszer idézi elő, mert :

1. az enzimrendszert mesterséges szubsztrátumokkal ki tudtuk mutatni,
2. a természetes barnulás és a mesterségesen kiváltott színreakciók helye és jellege megegyezik, (faparenchima, tracheidák, bélkorona és a kambium),
3. a specifikus PPO rendszert gátló anyagok mind a természetes, mind a mesterséges elszíneződést megakadályozták.

Vizsgálatainkból a gyakorlat számára az alábbi megállapításokat tartjuk fontosnak :

1. Nem betegséggel állunk szemben, hanem a növény természetes védekezéséről van szó. A keletkezett kinonok egyúttal sebezáró és antiszeptikus anyagok [Szent-Györgyi (13)].

2. Kétségtelen, hogy a barnafoltosság nagymértékű fellépését az egyes agro-technikai műveletek elősegítik. Elsősorban a meleg helyen történt előhajtás (hőoptimuma 35-40 C°), és a hiányos oltásforradás.

3. A jelenség az esetek többségében nem veszélyes, egyrészt, mert nem fertőző, másrészt, fellépése az egyébként egészséges, érett vesszőkben, illetve oltványokban és dugványokban nem jelenti a növény életképtelenségét. Bár igaz, hogy a kinonok a tracheák egy részét kikapcsolják, de mivel a jelenség az oltás után keletkezett farészre nem terjed át, ezt a növény aránylag könnyen »kinövi«. Végtelen csak éretlen (rossz fa és bélszövet arány, 1 : 1-nél kevesebb), vesszőben lehet, ahol az amúgy is kevés tartaléktápanyag a megbarnult sejtekben reked. Az ilyen vesszőt azonban más agrotechnikai nézőpontból sem szabad oltásra felhasználni. A 15-20 éves, vagy még ennél is idősebb tőkék hirtelen leromlása semmiképpen sem vezethető vissza az oltáskor keletkezett barnafoltosságra, mert az oltás után létrejött szövetelemek a növény fejlődését biztosítják és az oltáskor megbarnult részek erre az időre amúgy is régen kikapcsolódtak volna. Tehát a már

termő tőkék törpeágúsága, csalánosodása, — véleményünk szerint — a barnafoltossággal nem hozható kapcsolatba.

Mivel azonban a barnafoltosság kisebb-nagyobb mértékben mindenegyes oltványnak hibája, megkíséreltük az *in vitro* kísérletekben bevált anyagokkal meggátolni. Az ily módon kezelt oltványaink most vannak kiiskolázva. Véleményünk szerint nem szükséges, sőt nem is kívánatos a jelenség teljes meggátolása, hanem meg kell elégednünk annak csökkentésével, mert nem szabad a növényt sebező és dezinficiáló anyagától teljesen megfosztani.

Érkezett: 1953. július 25.

### Irodalom

1. Barra, I.: Magyar Bor és Gyümölcs 3. 9. 1948.
2. Barra, I.: Szaporításra használt szőlőtőkék és oltványok hibái és az abból eredő károk. (Kézirat.)
3. Barra, I.: Borászati Lapok. 71. 1. 1939.
4. Barra, I. & Hegedüs, A.: Szől. Kut. Int. Évkönyve. 10. 89. Budapest 1950.
5. Dawson, C. R. & Tarpley, W. B.: Tyrosinase (Polyphenoloxidase) cit. J. B. Sumner & Myrbäck: The Enzymes. II. 1. New York, 1951. Academic Press.
6. Kuporickája, K. I.: Vinodelie i vinogradarstvo 2. 48.
7. Palladin, V. I.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 55. 207. 1908.
8. Raper, H. S.: Die Methoden der Fermentforschung. 3. 2466. cit. Bamann & Myrbäck Leipzig 1940—41. Georg. Thieme.
9. Raper, H. S.: Ergeb. Enzymforsch. 1. B. 271. 1932.
10. Raper, H. S. & Wormall, N.: Biochem. J. 17. 454. 1923.
11. Steele, C. C.: An Introduction to Plant Biochemistry. London. 1949.
12. Sumner, J. B. & Somers, G. F.: Chemistry and Methods of Enzymes. New York. 1947.
13. Sutter, H.: Ergeb. Enzymforsch. 5. B. 273. 1936.
14. Tauber, H.: The Chemistry and Technology of Enzymes. New York. 1950.
15. Zweigelt, F.: Das Weinland, 258. 1933.

### О БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ ПРИВИВОК ВИНОГРАДА

Й. Эйферт

Опытная Лаборатория по Виноградарству, Виллань

#### Выводы

1. Известная «бурая пятнистость» прививок и чубуков винограда. В тканях, уже присутствующих при прививке или черенковании — особенно в трахеях, паренхиме древесины и трахеидах, частично и в пещеристых волокнах, клетках сердцевинных лучей и в кроне сердцевины появляется бурое, камедеподобное вещество. Это явление не распространяется на части, образовавшиеся в ходе дальнейшего утолщения.

2. Вышеописанное явление объяснялось различными авторами противоречно и заболеваниями неодинакового характера.

3. Автором было установлено, что бурая пятнистость появляется лишь вследствие ранения — в данном случае обрезки — и только при наличии воздуха; кислорода ( $O_2$ ). Ее температурный оптимум — 35—40° по Цельсию. Бурая пятнистость является термолабильной. Оптимальная величина pH для нее — от 7,5 до 8,5. CO и HCN совершенно препятствовали побурению. В зимний период покоя виноградной лозы явление наступает значительно слабее и протяжнее. Эти данные подтверждают, что побурение — процесс окисления, катализируемый системой ферментов.

4. Как известно, в образовании бурых, камедеподобных веществ — хинонов — участвуют системы ферментов тирозиназы (ППО) и лакказы. Так как CO не тормозит лакказу, но препятствует естественному побурению, в процессе может играть роль только система ППО.

5. В тканях виноградной лозы отдельные важнейшие направления действия ППО были локализованы гистохимическими методами, что подтверждалось также и реакциями вытяжек из различных частей лозы.

6. Окисление искусственно внесенных субстратов показало следующее: а) монофенолазы (субстрат: п-м-крезол, феноль, тирозин) находятся главным образом в системе тканей древесины; б) полифенолазы (субстрат: гваяковая смола) присутствуют вообще; в) наличие ортофенолаза или парафенолаза показывается окислением катехоля и пирогаллола или гидрохинона (см. рис. 10 А).

7. Можно установить, что в виноградной лозе направление ППО преобладает в системе тканей луба и оно интенсивное также и в тканях древесины. Монофенолазы присутствуют в тканях древесины и интенсивны также и в камбии. — Лакказы, а также пероксидазы присутствуют в большом количестве в виноградной лозе, но в этом процессе они не могут играть непосредственной роли, так как ни одна из них не может быть торможена помощью СО, хотя естественное побурение совершенно препятствуется этим.

8. Картина побурения при искусственном внесении субстратов совершенно одинакова с естественным побурением срезов. На более отдаленном от среза поперечном сечении лозы система тканей луба не оказывается побуренной. По мнению автора, это объясняется тем, что содержимое клеток системы тканей луба на поверхности совершенно превращается в хинонные вещества и образует механический защитный слой против проникновения воздуха, в то время как в трахеях системы тканей древесины с большими полостями, которые не могут полностью закупориться (лишены плазмы), воздух глубоко проникает и на указанных местах наступает охинонение.

9. Известные вещества, тормозящие ППО (п-нитрофеноль, аллилтиокарбамид, тиокарбамид и аскорбиновая кислота) *in vitro* препятствовали побурению; опыты *in vivo* проводятся теперь.

10. В заключение можно установить, что бурая пятнистость является процессом охинонения, представляющий результат изменения в системе окисления-восстановления. Она вызывается ранением (обрезкой). Некоторые приемы агротехники еще более способствуют ее развитию (температура кильчевания).

Таким образом, нельзя говорить о заразном заболевании и нельзя также объяснить этим вырождение старых кустов. Явление представляет серьезную опасность лишь у незрелых лоз, и так непригодных для использования, где прививка лишилась бы даже своих малых запасов питательных веществ. Его полное заторможение не кажется целесообразным так как здесь мы имеем дело с естественной защитой растения.

Рис. 1. Место срастания двухлетней привитой лозы в продольном разрезе. Части с бурыми пятнами в древесине первого года. Стрелкой обозначено место срастания привоя. Берляндьери х Рипария Т. 5 Ц + Кекфранкош.

Рис. 2. Поперечные сечения ствола пятилетней прививки винограда с бурыми пятнами (Берляндьери х Рипария ТК 5 ББ + Кекфранкош). Слева направо: а) на расстоянии 4 см от основания, б) на расстоянии 15 см от основания, в) на расстоянии 25 см от основания (среднее междузлие), г) на месте прививки.

Рис. 3. Клетки сердцевинных лучей и паренхимы в непосредственном соседстве с трахеями (Тг) интенсивно побурели. Стенки клеток также пронизаны бурой краской. + (Берляндьери х Рипария Т. 5 Ц + Кекфранкош). Увеличение — 230:1.

Рис. 4. Пещеристые волокна с бурыми пятнами в поперечном сечении. (Берляндьери х Рипария Т. 5 Ц + Кекфранкош). Увеличение — 230:1.

Рис. 5. Клетки трахеид и паренхимы с бурыми пятнами. (Рипария порталис + Кекфранкош). Увеличение — 290:1.

Рис. 6. Поперечное сечение ствола пятилетней прививки винограда. Ткани древесины первого года с бурыми пятнами резко ограничиваются от здоровых тканей второго года. (Берляндьери х Рипария Т. 5 Ц + Кекфранкош). Увеличение — 230:1.

Рис. 7. Ствол трехлетней прививки винограда (Берляндьери х Рипария Т. 5 Ц + Кекфранкош) в продольном разрезе.

Рис. 8. См. рис. 7; второй узел снизу того же самого подвоя.

Рис. 9. Трахеи окружены кольцом побуревших паренхиматических клеток. (Рипария порталис + Кекфранкош). Увеличение — 230:1.

Рис. 10. А. Места окисления субстратов. В. Естественное побурение среза. С. Картина бурой пятнистости в поперечном сечении. 1. Тирозин. 2. Феноль. 3. п-м-Крезоль. 4. Катехоль. 5. Пирогаллоль. 6. Гваяковая смола. 7. Гидрохинон. 8. п-Фенилендиамин. 9. Сердцевина. 10. Крона сердцевины. 11. Трахея. 12. Камбий. 13. Пробковая ткань. 14. Мягкий луб. 15. Твердый луб. 16. Пробкообразовательный слой.

Рис. 11. Оптимальная величина рН для окисления п-крезоля.

Табл. (1) Субстрат. (2) Вытяжка из луба. (3) Вытяжка из древесины. (4) Сырой. (5) Кипяченый. (6) Насыщенный СО-м. Степень окрашивания: — = не наблюдается, + = слабая, ++ = средняя, +++ = сильная.



## On the Brown Spottedness Necrosis of Vine Grafts and on the Role of the Systems of Oxidizing Enzymes Responsible for It

J. EIFERT

Experimental Laboratory for Vine-culture, Villány

### Summary

1. The »brown spottedness« of vine slips and grafts is a phenomenon known since long. A brown gummy substance appears in the tissues existing at slipping or grafting, especially in tracheas, wood parenchymas and tracheids, and partly in diaphragmatic fibres, phloem and pith. This phenomenon does not extend to tissues formed during subsequent development. The measure of browning decreases with the distance from the cutting plane.

2. Controversial explanations of this phenomenon are to be found in the literature, mostly supposing its connection with diseases of other nature.

3. The author has stated that brown spottedness occurs only in the presence of air or oxygen, respectively, and owing to lesions (in case of experiments to the preparation of sections). Its temperature optimum ranges 35—40°. It is thermolabile. The optimal pH ranges 7.5—8.5. The presence of CO and HCN completely prevented browning. The phenomenon was significantly weaker and slower in the winter resting stage of vine. All these data confirm that an oxidation process catalysed by an enzyme system takes place.

4. It is known that tyrosinase (PPO) and laccase enzyme systems participate in the formation of brown gummy substances: quinones. Since CO does not inhibit the action of laccase, prevents, however, the natural browning, obviously only the system PPO can play a role in the process.

5. Certain important directions of PPO action have been identified in the tissues of vine, confirmed by tests in extracts prepared from various portions of vine.

6. The oxidation of substrates introduced artificially indicated: a) that *monophenolases* (substrate: p-m-cresol, phenol, tyrosine) are present chiefly in the wood tissue system; b) *polyphenolases* (substrate: guaiac resin) are generally present; c) the presence of *orthophenolases* and *paraphenolases*, respectively, is shown by the oxidation of catechol and pyrogallol and hydroquinone, respectively.

7. It has been stated that the direction PPO is predominant in the system of epidermis tissues of vine and it is also intensive in the wood tissues. *Monophenolases* are present in the wood tissues and they are intensive in cambium. Laccase and peroxidase can be detected in vine in great amount. They can not play, however, a direct role in this process since their action can not be inhibited by CO. The natural browning is, on the contrary, completely prevented by CO.

8. The browning process caused by artificially introduced substrates proved completely identical with the natural browning of dissected surfaces. The epidermis tissue system showed no browning in the vine section lying farther from the dissected surface. This is explained by presuming that the cell content of the tissue system of the epidermis is converted on the surface completely into quinone-like substances and forms a mechanical protecting layer against the effects of air. On the other hand, air can readily intrude into the depth of the extended tracheas of the wood tissue system without plasm which can not be filled up. Thus the formation of quinones occurs in the spots mentioned.

9. All known substances inhibiting browning (as p-nitrophenol, allylthiourea, thiourea and ascorbic acid) prevented *in vitro* browning. Experiments to test the effects *in vivo* are in progress.

10. As a conclusion it can be stated that brown spottedness is a process of quinone formation due to a shift in the oxido-reducing system of the plant, induced by a lesion (preparation of a dissected surface). Certain agrotechnical processes (as the temperature of pre-sprouting), greatly encourage the development of brown spottedness.

The possibility of an infectious disease must be completely excluded as a cause of deterioration of aged vines. Brown spottedness is a great damage only in young vines unsuitable for production where the scion loses thus its limited reserve supply of nutrients. Complete prevention does not seem practical since the process is a natural self-defence of the plant.

Fig. 1. Longitudinal section of scars in vine graft aged two years. Brown spotted portions in first-year wood. The arrow indicates the place of the scar of the scion. *Berlandieri* × *Riparia* T.5C + *Kékfrankos*.

Fig. 2. Sections of the stem of a brown spotted vine graft aged 5 years (*Berlandieri* × *Riparia* T. K. 5BB + *Kékfrankos*). Left to right: a) 4 cm from the stem, b) 15 cm from the stem, c) 25 cm from the stem (central internodium), d) in the place of grafting.

Fig. 3. Phloem and parenchyma cells in the closest vicinity of tracheas (Tr) turned intensively brown. The brown substance impregnated also cell walls (*Berlandieri*  $\times$  *Riparia* T. 5C + *Kékfrankos*). Enlargement 230 : 1.

Fig. 4. Cross section of brown spotted diaphragmatic fibres (*Berlandieri*  $\times$  *Riparia* T. 5C + *Kékfrankos*). Enlargement 230 : 1.

Fig. 5. Brown spotted tracheid and parenchyma cells. (*Riparia portalis* + *Kékfrankos*). Enlargement 290 : 1.

Fig. 6. Section of stem of a vine graft aged five years. The brown spotted first-year wood tissues are clearly discernible from the healthy second-year ones (*Berlandieri*  $\times$  *Riparia* T. 5C + *Kékfrankos*). Enlargement 230 : 1.

Fig. 7. Longitudinal section of stem of a vine graft aged three years (*Berlandieri*  $\times$  *Riparia* T. 5C + *Kékfrankos*).

Fig. 8. As Fig. 7. Another nodus of the same vine.

Fig. 9. Tracheas are surrounded by a ring of browned parenchyma cells.

Fig. 10. A. Spots of oxidation by various substrates. B. Natural browning of dissected surfaces. C. Cross section of brown spotted ones: 1. Tyrosine, 2. phenol, 3. p-m-cresol, 4. catechol, 5. pyrogallol, 6. guaiac resin, 7. hydroquinone, 8. p-phenylene-diamine, 9. Pith, 10. Phloem, 11. Trachea, 12. Cambium, 13. Cork tissue, 14. Soft bark (Cortex), 15. Corky bark, 16. Cork cambium.

Fig. 11. Optimal pH value of oxidation of p-cresol.

Table 1. (1) Substrate. (2) Extract of epidermis tissue. (3) Wood extract. (4) Crude. (5) Boiled. (6) Saturated by CO. Degrees of decolouration: — absent, + weak, ++ medium, +++ strong.

## Sur la nécrose à taches brunes des greffes de vigne et sur le rôle des enzymes oxydateurs la produisant

J. EIFERT

Laboratoire Expérimental de Viticulture, Villány

### Résumé

1. La nécrose à taches brunes des greffes et des boutures de vigne est connue depuis longtemps. Lors de la greffe et la plantation des boutures, respectivement, il y a apparition d'une matière brune, d'apparence gommeuse, dans les tissus déjà existants, surtout dans les trachées, les parenchymes et les trachéides du bois et, en partie, dans les fibres à diaphragmes, les cellules des rayons médullaires et le canal médullaire. Ce phénomène ne se propage pas sur les parties formées au cours du développement ultérieur. Le degré de la brunissure diminue à partir de la surface taillée.

2. Ce phénomène a trouvé des explications contradictoires dans la littérature et on l'a mis en rapport avec des maladies d'un autre caractère.

3. Nous avons établi que les taches brunes ne se forment qu'en suite d'une lésion, dans notre cas à la suite de l'entaille et seulement en présence d'air, c'est-à-dire d'oxygène libre.

La température optimale est de 35 à 40° C. Le phénomène est thermolabil. Le pH optimal est 7,5 à 8,5. Le monoxyde de carbone et l'acide cyanhydrique l'ont complètement empêchés. Pendant la période du repos hivernal du sarment le processus est considérablement plus faible et plus traînant. Ces observations prouvent qu'il s'agit d'un phénomène oxydateur, catalisé par un système d'enzymes.

4. Il est bien connu que la formation de matières brunes, à apparence gommeuses, de quinones est effectuée par les systèmes enzymatiques de la tyrosinase (PPO) et de la laccase. Comme le monoxyde de carbone n'entrave pas la laccase et cependant elle entrave la brunissure, c'est seulement le système PPO qui peut y avoir un rôle.

5. Nous avons localisé dans les tissus du sarment par des méthodes histochimiques les directions les plus importantes du fonctionnement du système PPO, ce qui a été vérifié par les réactions des extraits préparés des différentes parties du sarment.

6. L'oxydation de substrats artificiellement introduits a donné: a) les monophénolases (substrat: p-m-crésol, phénol, tyrosine) sont répandues surtout dans les tissus ligneux; b) les polyphénolases (substrat: résine de gaïac) sont généralement présentes; la présence des ortho-

phénolases et paraphénolases est indiqué par l'oxydation du catéchol et de l'hydroquinone (voir fig. 10, 1 à 8).

7. L'on peut établir que dans le sarment la direction PPO est dominante dans les tissus du liber, elle est ainsi intensive dans les tissus du bois. Les monophénolases sont présentes dans les tissus du bois et elles sont intensives dans le cambium. La laccase et la peroxidase sont démontrables en grande quantité dans le sarment, mais dans ce phénomène elles ne peuvent jouer un rôle immédiat, parce qu'aucune d'elles n'est entravée par le monoxyde de carbone, tandis que ce corps empêche complètement le brunissement naturel.

8. L'image que donnent les substrats introduits artificiellement est identique à celui du brunissement naturel de la surface taillée. Dans les sections transversales faites plus loin de la surface taillée les tissus du liber n'ont pas brunis. A notre avis c'est parce que le contenu des cellules des tissus du liber se transforme complètement en matières quinoniques sur la surface et forme une couche protectrice contre la pénétration de l'air, tandis que l'air pénètre profondément dans les trachées à grands lumens des tissus du bois, qui ne peuvent pas se boucher complètement (étant sans plasma) et ainsi la formation des quinones peut s'y effectuer.

9. Les substances connues entravent le système PPO (p-nitrophénole, allylthiocarbamide, thiocarbamide et acide ascorbique) ont empêché le brunissement in vitro, les expériences in vivo sont en cours.

10. En résumé l'on peut établir que la formation des taches brunes est un processus de formation de quinones par suite d'un changement dans le système oxydo-réducteur de la plante. La cause initiale en est la lésion. Certains procédés agrotechniques en favorisent le développement (température du forçage).

Il ne peut donc être question d'une maladie infectieuse et l'on ne peut pas y ramener le dépérissement des vieilles souches. Le brunissement ne constitue un danger que pour les sarments mal acotés, impropres à l'usage, dans lesquels il pourrait priver la plante de ses matières de réserves déjà insuffisantes. Il ne paraît pas utile de l'empêcher entièrement puisqu'il s'agit d'une mode de défense naturelle de la plante.

Fig. 1. Coupe longitudinale de la soudure d'une greffe de 2 ans. Parties brunes dans le bois de la 1<sup>re</sup> année. La flèche indique la soudure du greffon. Berlandieri x Riparia T. 5 C Kékfrankos.

Fig. 2. Greffe de 5 ans présentant des taches brunes (Berlandieri x Riparia T. K. 5 BB Kékfrankos). Coupes transversales. De droite à gauche : a) à 4 cm de la tige, b) à 15 de la tige, c) à 25 cm de la tige (internode moyen), d) sur l'endroit de la greffe.

Fig. 3. Les cellules du rayon médullaires et de la parenchyme dans le voisinage immédiat des trachées (Tr) sont intensivement brunes. La matière colorante brune a pénétré aussi dans les parois des cellules (Berlandieri x Riparia T. 5 C + Kékfrankos) Gross. 230 : 1.

Fig. 4. Coupes verticales des fibres cloisonnées brunes (Berlandieri x Riparia T. 5 C + Kékfrankos). Gross. 230 : 1.

Fig. 5. Cellules de trachéides et de parenchyme brunes (Riparia portalis + Kékfrankos) Gross. 290 : 1.

Fig. 6. Coupe transversale de la tige d'une greffe de 5 ans. Les tissus du bois de la première année brunis se différencient nettement des tissus sains de la deuxième année. (Berlandieri x Riparia T. 5 C + Kékfrankos). Gross. 230 : 1.

Fig. 7. Coupe longitudinale du tronc d'une greffe de 3 ans. (Berlandieri x Riparia T. 5 C + Kékfrankos.)

Fig. 8. Comme la fig. 7. La deuxième noeud d'en bas du même sujet.

Fig. 9. Les trachées sont entourées en forme d'anneau par les cellules parenchymatiques brunes (Riparia portalis + Kékfrankos). Gross. 230 : 1.

Fig. 10. A) Endroits de l'oxydation des substrats. B) Brunissement naturel de la surface taillée. C) Coupe transversale de l'endroit brun. 1. Tyrosinase. 2. Phénol. 3. p-m crésol. 4. Catéchol. 5. Pyrogallol. 6. Résine de gaiac. 7. Hydroquinone. 8. p-phenylene-diamine. 9. Moelle. 10. Canal médullaire. 11. Trachée. 12. Cambium. 13. Tissu liégeux. 14. Liber mou. 15. Liber dur. 16. Assise phélogène.

Fig. 11. Optimum du pH de l'oxydation du p-crésol.

Tableau 1. (1) Substrat. (2) Extrait du liber. (3) Extrait du bois. (4) Cru. (5) Bouilli. (6) Saturé de CO. Les grades de la décoloration : — absence, + faibles, ++ moyen, +++ fort.